



甲胎蛋白 (AFP) 对正常人淋巴 细胞的作用*

洪锦心 胡江琴 张前进 田培坤 余新生

(上海市肿瘤研究所免疫学、细胞生物学研究室)

在胚胎期和某些疾病情况下大量合成AFP究竟起什么生理功能,这是近年来AFP研究中比较引人注目的一个方向^[1-6],也是AFP研究中尚待介决的一个问题。我们试图以体外细胞免疫方法探讨AFP对正常人淋巴细胞的作用。

材料方法

1. 血清处理: 无菌收集混合脐带血清(含AFP50微克/毫升),一份过滤灭菌保存待用,另一份通过接有AFP抗体的亲和层析以去尽所含AFP,流出液经检测AFP含量小于20毫微克/毫升,然后过滤灭菌待用。同法分别收集的正常人混合血清及含AFP的肝癌病人混合血清。以上血清均经蛋白定量,使用时调至总蛋白量相等。

2. 纯化AFP制备: 胎儿匀浆生理盐水浸出液,用硫酸胺沉淀法及亲和层析法制备,制品中AFP含量在98%以上。无菌过滤后冰冻干燥待用。

3. 淋巴细胞转化试验: 采用观察淋巴细胞分裂相的方法^[7]。本实验中用肝素抗凝的正常人全血0.2毫升,先加入脐带血清0.5毫升,37℃温育1小时(AFP浓度为27微克/毫升)再加入0.1毫升PHA和RPMI1640培养液使最后体积为2毫升(AFP最后浓度为9.4微克/毫升)37℃培养进行淋转试验,每次2—3复份。共测11例正常人。

4. 淋巴细胞分离: 肝素抗凝正常人全血用比重1.077的Ficoll泛影葡胺梯度离心,800g,离心15分钟,分离的细胞用Hank's液

洗三次,计数,调至所需浓度待用。

5. ERFC(E玫瑰花)试验: 0.2毫升试验血清与50万淋巴细胞混合,37℃温育30分钟(如用提纯的AFP,则加入AFP溶液40毫升)后,用Hank's液洗二次,加入洗过3次的绵羊红血球(SRBC)悬液0.1毫升,淋巴细胞与SRBC比例为1:50,混合后37℃温育15分钟,500转/分,离心5分钟后于4℃放置2小时,制片观察,有4个或4个以上SRBC粘附的为ERFC阳性细胞,计数整个淋巴细胞群体中ERFC的百分比。每次两个复份。共测定16例经脐带血清处理的正常人淋巴细胞的ERFC,8例经肝癌血清处理的及6例由纯化AFP处理的淋巴细胞。

6. ARFC(Active玫瑰花)试验: 用稍加改良的Smith方法进行^[8],淋巴细胞处理同ERFC试验,但离心后不放置在4℃而是立即固定涂片。温度对ARFC有较大影响,以保持在20℃左右为宜。共测试8例经肝癌血清和脐带血清处理的,6例经纯化AFP处理的淋巴细胞。

7. PHA激活过的淋巴细胞的玫瑰花试验(巨大ERFC,巨大ARFC): 试验方法另有详述^[9],本实验中用经PHA活化72小时的淋巴细胞(约有50%是被活化的淋巴母细胞)经AFP处理后进行ERFC和ARFC试验,方法同前面介绍的ERFC和ARFC方法。两项试验各测定6例正常人。

* 本实验工作承本所许凯黎、关赛芳同志协助进行AFP纯化工作及检测工作,特此致谢

8. 微量淋巴细胞细胞毒性试验：用中科院细胞生物学研究所提供的肝癌细胞株7402作靶细胞,观察AFP对淋巴细胞的天然细胞毒性和PHA诱导的细胞毒性的影响。操作方法另有报道^[7],本实验中在实验组中加入提纯的AFP至最终浓度为155微克/毫升,两项试验各测试6例正常人。

实验结果

1. 含AFP的血清对ERFC和ARFC的影响：含AFP的脐带血清和肝癌病人血清,一般都不显示对ERFC和ARFC影响,但在ERFC试验中16例中有3例其ERFC被脐带血清所降低〔注：在本文实验中ERFC和ARFC实验组与对照组比较时,均以超过5%的变化作上升或下降,以摒除实验观察涂片时的计数误差〕但AFP去尽后的脐带血清对此三例淋巴细胞ERFC产生相同的降低作用。

(实验结果见表1,图1,图2)

表1. 脐带血清对3例供主ERFC的抑制

EKFC 供主	试样 %	试样		
		正常人混 合血清	含AFP脐 带血清(AFP 含量50微 克/毫升)	不含AFP 脐带血清
张 × ×		51	35	32
洪 × ×		74	59.5	60
顾 × ×		57	47	42

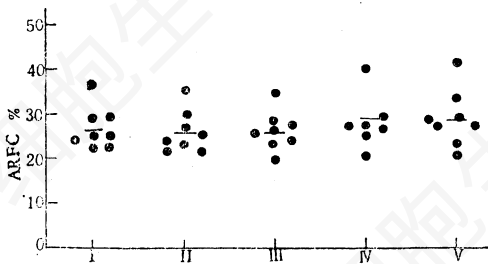


图1: 含AFP血清对ARFC的影响

I. 正常人血清, 平均值=26.04; II. 脐带血清, 平均值=25.83; III. 不含AFP脐带血清, 平均值=25.82; IV. 含AFP肝癌血清, 平均值=29.33; V. 不含AFP肝癌血清, 平均值=28.75.

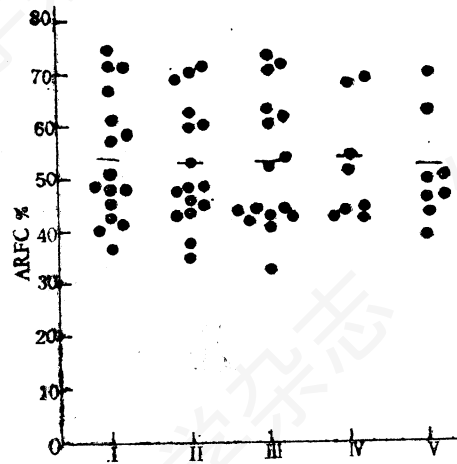


图2: 含AFP血清对ERFC的影响

I. 正常人血清, 平均值=53.75; II. 脐带血清, 平均值=52.38; III. 不含AFP脐带血清, 平均值=53.07; IV. 含AFP肝癌血清, 平均值=53.65; V. 不含AFP肝癌血清, 平均值=52.5.

2. 脐带血清对淋巴细胞转化的影响：与正常人血清相比,脐带血清显著抑制PHA刺激的淋巴细胞转化,然而AFP去尽的脐带血清产生同样显著的抑制作用。(见表2)

表2. 脐带血清对PHA刺激的淋巴细胞转化的影响

试样	正常人血清 (A)	脐带血清* (B)	不含AFP脐 带血清 (C)
淋巴细胞转化 (11例分裂相平均%)	43.07±9.77	32.66±8.98	32.1±8.4

* AFP最终浓度为9.4微克/毫升

统计处理: (A)组与(C)组相比

P<0.001

(B)组与(C)组相比

P>0.5

(student-t 试验计算)

3. 纯化的AFP对ERFC及ARFC的影响：各种浓度AFP对ERFC无影响(见表3),而对ARFC及巨大ARFC均有影响,但AFP对不同供主的淋巴细胞起的作用不同,且对不同供

表3 纯化AFP对ERFC影响*

AFP浓度 μg/ml	0	10	50	200	400	800
ERFC %	48±	45.5±	48.25	48.66	47.91±	49.67±
6例平均值	6.6	7.49	±7.73	±6.42	6.93	6.93

* 因AFP对各供主ERFC无显著影响故不一列出数值, 仅列平均值。

主淋巴细胞的阈值也不同。6例供主中3例AREC升高, 1例下降, 2例无变化(见图3)。

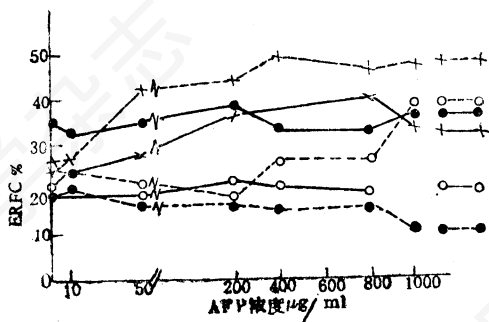


图3 AFP对ARFC的影响, 自上而下为

1. 供主: 洪×× 2. 供主: 方×× 3. 供主: 蒋××
4. 供主: 陈×× 5. 供主: 张×× 6. 供主: 诸××

表4 纯化AFP对巨大ARFC影响

巨大ARFC %	AFP浓度 μg/ml					
	0	10	50	200	400	800
供主						
诸××	20	22	23	22	17.5	18
胡××	9.5	10	11.5	12	11	19
田××	18.5	17.5	/	/	/	12
王××	14	15	15	14	14	9
阮××	15	14	/	10	8	8.5
蒋××	19	25	22	31.5	/	28

表5 纯化AFP对巨大ERFC影响

巨大ERFC %	AFP浓度 μg/ml					
	0	10	50	200	400	800
供主						
王××	20.5	18.5	19	16.5	18	19.5
张××(A)	19	/	24	26.5	19	20.5
高××	16	19	/	24	/	25.5
张××(B)	20	20.5	26	30	31.5	/
阮××	19	16	17	19	15	16.5
蒋××	35.5	31.5	28	31	31.5	33.5

表6 AFP对正常人天然淋巴细胞细胞毒性的影响

剩余靶细胞数	组别	靶细胞 (A)	靶细胞+淋巴细胞 (B)	靶细胞+淋巴细胞+AFP (C)	统计处理 <(B)组与(C)组相比>
供主					
张××(男)		422±60	215±20	263±26.5	P<0.025*
方××		422±60	96±16	150±33	P<0.001*
张××(女)		208±30	169±27	228±16	P<0.05*
阮××		213±24	152±28	145±27	P>0.5***
诸××		247.7±58.4	188±39.2	83.2±11.7	P<0.01**
王××		248±41.58	198±8.32	147±31.77	P<0.01**

* 供主淋巴细胞攻击能力被AFP抑制。

** 供主淋巴细胞攻击能力被增强。

*** AFP对供主淋巴细胞攻击力无显著影响。

还可见3例巨大AREC下降, 1例巨大ARFC上升(见表4)。而在巨大ERFC实验中除2例明显上升外, 还可见有二例在50微克/毫升AFP浓度时分别有上升或下降(见表5, 分别是张××(A), 蒋××), 但在高浓度时又回复到对照水平。

4. 纯化AFP对微量淋巴细胞细胞毒性的影响: 在实验中亦观察到AFP对不同供主的

淋巴细胞产生不同作用。在淋巴细胞天然细胞毒性试验中, 6例供主中有3例供主淋巴细胞毒性作用被抑制, 2例被增强, 1例无变化(见表6)。在PHA诱发的淋巴细胞毒性试验中, 仅1例供主淋巴细胞毒性被增强, 另一例被抑制(见表7)。实验中我们亦排除了AFP制品本身对靶细胞的毒性作用。(见表8)

表7 AFP对PHA刺激的正常人淋巴细胞细胞毒性的影响

剩余靶细胞数 供主	组别	靶细胞(A)	靶细胞+淋巴细胞+PHA(B)	靶细胞+淋巴细胞+PHA+AFP(C)	统计处理 <(B)组与(C)组相比>
沈××		112±28	50±22.9	33.17±11.31	P>0.2***
吴××		67±17.6	17±11.3	18±8.4	P>0.5***
洪××		88±11	21±1.6	3±3.95	P>0.01**
阮××		153±28	28±3	46±14	P<0.05*
诸××		187.83±35.71	19±10.8	14±4.6	P>0.5***
王××		248.3±37.96	85±14	72±13.4	P>0.5***

- * 供主淋巴细胞攻击能力被抑制。
- ** 供主淋巴细胞攻击能力被增强。
- *** AFP对供主淋巴细胞攻击力无显著影响。

表8 纯化AFP对靶细胞影响

实验次数	组别	剩余靶细胞数	统计处理
I	靶细胞	340.83±45.9	P>0.5*
	靶细胞+AFP	330.5±40.87	
II	靶细胞	355±24.22	P>0.5*
	靶细胞+AFP	368±52.36	

* 表明AFP制品不显著影响靶细胞生长

讨论

我们的实验显示脐带血清和AFP去尽后的脐带血清都能抑制PHA引起的正常人淋巴细胞转化及某些正常人(16例中3例)的ERFC, 提示脐带血清的免疫抑制作用可能不是AFP而是其他成分引起, 如母体血清中粘蛋白(mucoprotein)和糖蛋白^[10]及妊娠期某些激素^[11]等等。令人非常感兴趣的是Ladib等用新生小

鼠血清和羊水进行了类似实验^[12], 也观察到AFP去尽后的羊水及新生小鼠血清抑制淋巴细胞转化。

在我们提取的AFP制品进行的实验中, 较高浓度的AFP能影响一些供主淋巴细胞的ARFC, 巨大ERFC和巨大ARFC, 看来AFP不仅对T淋巴细胞的一个亚群ARFC淋巴细胞与SRBC的亲合力有影响, 而且对经PHA活化的淋巴细胞与SRBC的亲合力有影响。也注意到AFP对各供主淋巴细胞的作用是因人而异的, 可以引起免疫抑制作用, 也可以起增强作用。同时对供主淋巴细胞起影响的AFP浓度的阈值也各不相同。在ARFC试验中, AFP浓度为10微克/毫升时对各供主淋巴细胞都无显著作用, 在50微克/毫升浓度时仅有1例供主洪××ARFC上升。而AFP浓度为1000微克/毫升使4个供主ARFC变化, 因此AFP含量较低的样

品如脐带血清等,对正常人淋巴细胞的ARFC往往不能起作用。

我们还观察到AFP能影响某些正常人淋巴细胞天然细胞毒性和PHA诱发的细胞毒性,在AFP作用下有些供主淋巴细胞攻击能力被抑制了,有些不受影响,还有一些攻击力甚至被增强了。

根据上述AFP制品的初步实验结果,我们认为AFP不象是一种一般的免疫抑制剂,AFP对各个供主的淋巴细胞可能起不同的作用。关于AFP对淋巴细胞的作用,尚存在各种不同解释,Charpentier曾报道AFP能增强混合淋巴细胞反应^[13],Yachnin^[14]报导人体淋巴细胞中可能存在对抗AFP的亚群,Alpert等介绍^[15]AFP的免疫抑制可能是T细胞中的Ts(Suppressor Cell)所中介,……。我们还认为各供主淋巴细胞的亚群组成各不相同,在AFP作用下整个淋巴细胞群体的反应也表现不同。况且,已发现AFP不是单一成分,用等电点聚焦法至少可分成六种成分^[16],这些亚类的生物活性不一^[14,16],可能只是其中一种起免疫抑制作用。此外在制备AFP过程中往往可能把一些小分子带入,而正是这些小分子起着免疫抑制作用^[17]。这些虽能部分解释AFP实验中引起生物活性差异的原因,但可能尚有未了解的因素起着作用,Tomasi已作过详细的讨论^[17]。总之,了解淋巴细胞各亚群在AFP作用下的功能表现及AFP本身各亚类的不同作用,将有助于进一步深入了解AFP的生理功能。

小 结

利用淋巴细胞转化,ERFC、ARFC、巨大ARFC,巨大ERFC及微量淋巴细胞细胞毒性试验等体外细胞免疫方法研究人体脐带血清及纯化的AFP制品对正常人淋巴细胞的作用。结果提示脐带血清可引起的淋巴细胞转化的抑制并不是由血清中AFP所致。而纯化的抑制品有时能增强某些供主淋巴细胞的作用,有时则抑

制另一些供主淋巴细胞的作用,可见AFP对淋巴细胞的作用是复杂的,AFP不象是一种一般的免疫抑制剂。

参 考 文 献

- [1] Parmely, M. J., Hsu, H. F. *Fed. Proc.*, 32: 979 (1973)
- [2] Parmely, M. J., Thompson, J. S. *Ibid.* 33: 812 (1974)
- [3] Cadwell, J. L., Thompson, J. S. *Ibid.* 38: 979 (1973)
- [4] Murgita, R. A., and Tomsa, T. B. *J. exo. Med.* 141: 369 (1975)
- [5] Murgita, R. A., and Tomsa, T. B. *ibid.* 141: 440 (1975)
- [6] Dattwyler, R. J., and Tomsa, T. B. *Int. J. Cancer*, 16: 942 (1975)
- [7] 上海市肿瘤研究所免疫学、细胞生物化学研究室, 几种细胞免疫操作方法(交流资料1978)
- [8] 上海市肿瘤研究所免疫学、细胞生物化学研究室: 1977年度工作总结(内部资料)。
- [9] 上海市肿瘤研究所免疫学、细胞生物化学研究室: 洪锦心、胡江琴、田培坤, 张前进: 天津免疫会议资料(1978)
- [10] Cooperhand, S., Bondeo, K. H. and Schmid, K. *Science* 159: 1243 (1968)
- [11] Murgita, R. A., *Scan. J. Immunol.*, 5: 1003 (1976)
- [12] Labib, R. S., Thomas, B. and Tomsa, T. B. *Immunol. Communication.* 7: 223 (1978)
- [13] Charpentier, B., Guttman, R. P., Shuster, J. and Gold, P. *Ibid.* 119: 898 (1977)
- [14] Yacgini, S. and Lester, E. P., *J. Immunol.* 119: 555 (1977)
- [15] Alpert, E., Dienstag, J. L., Sepersky, S., Littman, B. and Rocklin, R. *Immunol. Communication* 7: 163 (1978)
- [16] Lester, E. P., Miller, J. B. and Yachnin, S., *Immunol. Communication* 7: 137 (1978)
- [17] Tomasi, T. B., Jr. *Cell Immunol.* 37: 459 (1978)